

# ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES CONJUGADOS DE HRP NO ESTUDO DAS VIAS NEURAIIS DAS ESTRUTURAS BUCOFACIAIS

Roelf Justino CRUZ-RIZZOLO\*  
Alessandra DEROGIS\*  
Fábio LORENZATO\*

- RESUMO: A utilização de neurotraçadores tem revolucionado, nas últimas três décadas, o conhecimento sobre o padrão de conexões entre as estruturas periféricas e o sistema nervoso. Entre os neurotraçadores, a peroxidase do rábano silvestre (HRP) tem sido a mais utilizada. Mais recentemente, combinações desse neurotraçador com a aglutinina do germe do trigo (WGA) ou com a subunidade B da toxina colérica (CTB) têm demonstrado um considerável aumento na captação dos conjugados resultantes (HRP-WGA, CTB-HRP), com melhora sensível na capacidade de traçar conexões neurais. No presente experimento, foram testados ambos os conjugados e o HRP livre no contexto de um amplo estudo sobre o núcleo do nervo hipoglosso do rato, responsável pela inervação motora da língua. Para isto, foram injetados na metade posterior da língua de cada rato 10 µl de HRP (20%) ou 10 µl de CTB-HRP (0,15% de toxina colérica + 12% HRP) ou 10 µl de HRP-WGA (5% de WGA + 30% HRP). Após um período de sobrevivência de 48 horas, os animais foram perfundidos com uma solução de aldeídos e, posteriormente, os encéfalos foram cortados em criostato (40 µm). Os cortes foram submetidos à reação histoquímica do HRP, utilizando-se a tetrametilbenzidina como cromógeno. Os resultados indicam que, tanto desde o ponto de vista qualitativo como até quantitativo, os conjugados são mais eficientes para evidenciar conexões neurais que o HRP livre. Os conjugados HRP-WGA e CTB-HRP apresentam qualidades semelhantes, embora este último seja

---

\* Departamento de Morfologia - Faculdade de Odontologia - UNESP - 16015-050 - Araçatuba - SP.

mais eficiente para evidenciar detalhes na arborização dendrítica e características morfológicas gerais dos motoneurônios. Essa superioridade do conjugado CTB-HRP pode estar relacionada com a abundância de gangliosídeos do tipo GM1 na membrana pré-sináptica das junções neuromusculares. Esses gangliosídeos formam um grupo de receptores específicos para componentes da subunidade B da toxina colérica, o que potencializa a captação da mesma pelos terminais axônicos.

- PALAVRAS-CHAVE: Neurotraçadores; peroxidase do rábano silvestre; aglutinina do germe de trigo; toxina colérica; núcleo do nervo hipoglosso.

## Introdução

A utilização de neurotraçadores tem revolucionado nas últimas três décadas o conhecimento sobre o padrão conectivo entre as estruturas periféricas e o sistema nervoso, assim como entre as diversas áreas do sistema nervoso central. Esses neurotraçadores têm como característica principal a capacidade de, uma vez injetados, serem incorporados por neurônios e transportados, após um período de sobrevivência variável, de forma retrógrada (desde a terminação axônica até o corpo celular) e/ou anterógrada (desde o corpo celular até os terminais axônicos). Essas substâncias parecem não ser incorporadas por fibras de passagem intactas, o que representa uma vantagem sobre os métodos tradicionais de traçado de vias nervosas, baseados na impregnação de fibras ou corpos neuronais degenerados após lesão.

Entre os neurotraçadores, a peroxidase do rábano silvestre (HRP) tem sido a mais utilizada fundamentalmente como traçador neuronal retrógrado. A demonstração inequívoca de uma conexão neural por intermédio da utilização de HRP como neurotraçador remonta ao ano de 1971, quando Kristensson & Olsson<sup>6</sup> registraram o transporte retrógrado de HRP injetada intramuscularmente, e sua acumulação em motoneurônios espinais. Posteriormente, LaVail & LaVail<sup>7</sup> demonstraram um transporte retrógrado análogo ao observado por Kristensson & Olsson,<sup>6</sup> dessa vez no sistema nervoso central. A partir daí, a quantidade de trabalhos utilizando este neurotraçador tem sido enorme (ver Mesulam).<sup>9</sup>

Mais recentemente, combinações desse neurotraçador com a aglutinina do germe de trigo (WGA) ou com a subunidade B da toxina colérica (CTB) têm demonstrado um considerável aumento na captação dos conjugados resultantes (HRP-WGA, CTB-HRP).<sup>1,2,3,4,8,14</sup>

A escolha do neurotraçador a ser utilizado num experimento de traçado de vias nervosas deve ser avaliada cuidadosamente pelo pes-

quisador. Dados como quantidade necessária a ser injetada para obter uma marcação visível ao microscópio, tempos de sobrevivência necessários para o transporte, características do neurotraçador quanto à sua capacidade de ser transportado retrógrada ou anterogradamente, devem ser levados em consideração. No presente experimento, avaliamos a capacidade de marcação dos conjugados HRP-WGA, CTB-HRP e HRP livre após injeção intramuscular dos mesmos, no contexto de um amplo estudo sobre o núcleo do nervo hipoglosso (XII), responsável pela inervação motora da língua.

## **Material e método**

Para o presente experimento, foram utilizados ratos albinos machos, adultos. Nesses ratos, previamente anestesiados com uma solução de hidrato de cloral a 10% (0,4 ml/100 g, ip), foram injetados na metade posterior da língua, por intermédio de uma seringa Hamilton, 10 µl de HRP livre a uma concentração de 20%, ou 10 µl de CTB-HRP (0,15% de toxina colérica + 20% HRP) ou 10 µl de HRP-WGA (5% de WGA-HRP + 30% HRP). Essas concentrações foram escolhidas por serem as mais comumente utilizadas, conforme observamos na literatura consultada.<sup>1,2,3,4,5,8,10,11,13,14</sup>

Após um período de sobrevivência de 48 horas, necessário para o transporte dos neurotraçadores, os animais foram novamente anestesiados e perfundidos via cardíaca mediante a utilização de uma bomba peristáltica. Foram perfundidos inicialmente 100 ml de solução salina à temperatura ambiente (NaCl 0,9%), a seguir 300 ml de solução fixadora composta por paraformaldeído 1% mais glutaraldeído 1,25% dissolvidos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3. Finalmente, soluções de sacarose a 5%, 10% e 20% dissolvidas em tampão fosfato 0,1 M (100 ml cada) a 4 °C foram perfundidas com a finalidade de iniciar a crioproteção do tecido e retirar o excesso de aldeídos. Os animais foram posteriormente decapitados, os encéfalos removidos e mantidos em sacarose a 20% e, após o afundamento do encéfalo nessa solução, colocados em sacarose a 30%.

Uma vez crioprotetidos, os encéfalos foram cortados em um criostato, de forma seriada, e os cortes recolhidos em tampão fosfato 0,1 M, em duas séries. Ambas foram submetidas à reação histoquímica necessária para a evidenciação do HRP, utilizando a tetrametilbenzidina como cromógeno, conforme descrição de Mesulam,<sup>9</sup> e uma delas contracoradas com vermelho neutro a 1%. Os cortes foram posteriormente

montados em lâminas gelatinizadas, desidratados, cobertos com lamínula e estudados em microscopia de campo claro e campo escuro. Campos representativos foram fotografados em diversos aumentos.

Para a análise comparativa dos neurotraçadores, levamos em consideração a intensidade da marcação observada, que está em relação direta com o número de grânulos de HRP oxidados no processo histoquímico, o que por sua vez indica a quantidade do neurotraçador que foi captada no terminal axônico; assim como a capacidade apresentada pelo neurotraçador em preencher o corpo celular e a árvore dendrítica do motoneurônio.

## Resultado

A reação histoquímica utilizando a tetrametilbenzidina, evidenciou, em todos os casos, o HRP incorporado pelos neurônios (Figuras 1 e 2). A marcação pode ser visualizada em forma de grânulos de tonalidade azul-escura, ocupando o soma e, dependendo do neurotraçador, as fibras dendríticas e axônicas (Figuras 2-A, B).

Dos neurotraçadores utilizados, os conjugados CTB-HRP e HRP-WGA foram os que apresentaram um melhor resultado (Figuras 1-A, B). Os corpos celulares apresentaram, após injeção desses neurotraçadores, uma reação intensa, o que permitiu, mesmo a pequenos aumentos, observar um grande número de neurônios marcados, com uma grande quantidade de grânulos que, na maioria dos casos, impediu visualizar o núcleo.

O preenchimento do soma foi quase sempre completo, não se limitando a regiões específicas. Após a injeção do conjugado CTB-HRP, observamos que a árvore dendrítica foi evidenciada com maiores detalhes em relação aos outros dois traçadores (Figura 1-A), fundamentalmente quando observado em microscopia de campo escuro, sendo possível observar dendritos de primeira, segunda e até terceira ordem.

Nessas condições de observação, algumas dessas fibras foram visíveis mesmo a alguns milímetros de distância do núcleo do nervo hipoglossal. O HRP-WGA foi também bastante efetivo embora o preenchimento da árvore dendrítica tenha sido menos evidente (Figura 1-A). Por outra parte, e como característica exclusiva do HRP-WGA, observamos, ao estudar em microscopia de campo escuro, fibras nervosas positivas para HRP na região dorsolateral do tronco (Figura 2-A). Essa região cor-

responde ao tracto e núcleo espinal do nervo trigêmeo, responsável pela inervação sensitiva da língua. Os somas de origem dessas fibras sensitivas somáticas localizam-se no gânglio trigeminal e enviam seu axônio periférico à pele e mucosas bucofaciais, onde captam estímulos relacionados com a sensibilidade geral, e o seu axônio central aos núcleos trigeminais sensitivos. Assim, utilizando o HRP-WGA, além da marcação dos corpos neuronais (retrógrada) no núcleo do nervo hipoglosso, responsável pela motricidade da língua (Figura 1-A), observamos marcação de fibras e terminais axônicos (anterógrada) em núcleos sensitivos trigeminais responsáveis pela sensibilidade geral da mucosa lingual (Figura 2-A).

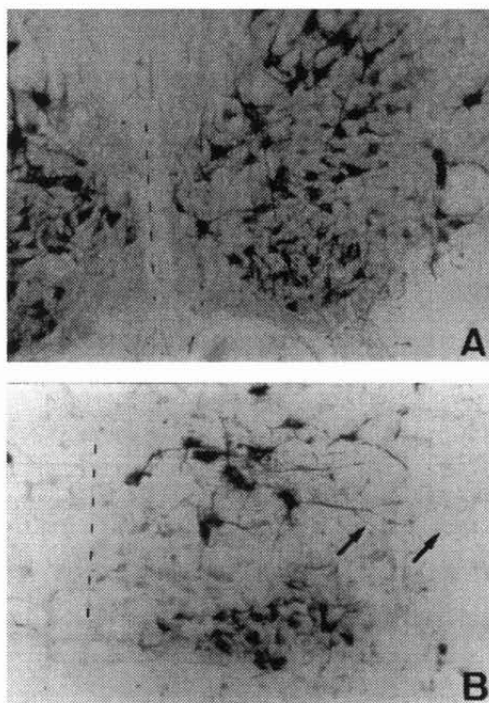


FIGURA 1 – A) Fotomicrografia do núcleo do nervo hipoglosso de rato, onde foi injetado na metade posterior da língua o conjugado HRP-WGA. A linha pontilhada indica aproximadamente a linha média (250x). B) Fotomicrografia do núcleo do nervo hipoglosso de rato, onde foi injetado na metade posterior da língua o conjugado CTB-HRP. Observar o preenchimento da árvore dendrítica (setas, 250x).

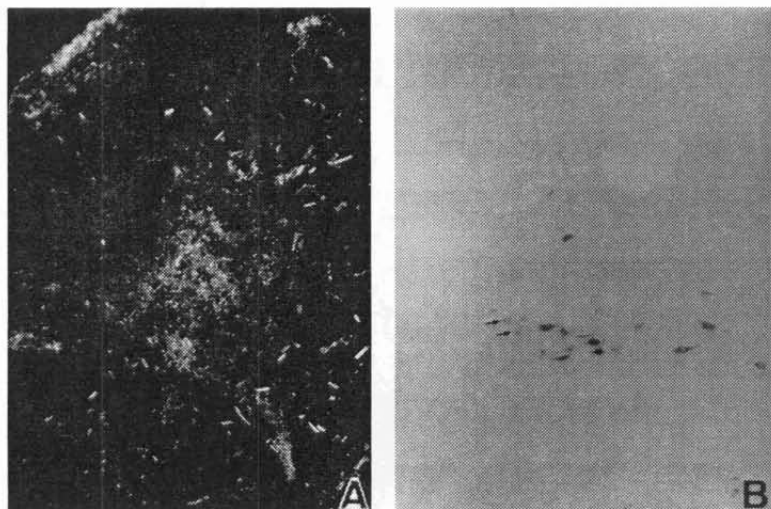


FIGURA 2 - A) Fotomicrografia em campo escuro, onde pode ser visualizada no centro da figura a marcação de fibras HRP positivas no núcleo espinal do nervo trigêmeo após injeção do conjugado HRP-WGA na metade posterior da língua (250x). B) Fotomicrografia do núcleo do nervo hipoglosso de rato, onde foi injetado, na metade posterior da língua, HRP livre. Observar a pequena quantidade de neurônios marcados, alguns deles pobremente marcados (setas), e a total falta de marcação da árvore dendrítica (250x).

As injeções com HRP livre provocaram uma marcação muito menos intensa que a observada após o uso dos conjugados (Figura 2-B). A evidenciação da árvore dendrítica foi praticamente inexistente e, em muitos casos, a observação da marcação só foi possível mediante a utilização de objetivas de grande aumento.

Em relação ao padrão geral do núcleo do nervo hipoglosso, observamos que ele é composto de motoneurônios multipolares e fusiformes que formam uma coluna de sentido rostro-caudal que se estende desde o terço caudal do bulbo até os dois primeiros segmentos medulares, imediatamente ventral ao quarto ventrículo. Embora não fosse o objetivo deste trabalho descrever o núcleo do nervo hipoglosso e sim a qualidade da marcação observada após a utilização dos diferentes neurotraçadores, nossa observação do padrão arquitetônico geral desse núcleo confirmou as descrições anteriores.<sup>14</sup>

## Discussão

Nossos resultados indicam que, como marcador retrógrado, os conjugados CTB-HRP e HRP-WGA apresentam uma eficácia semelhante, e ambos conjugados apresentam uma superioridade acentuada em relação ao HRP livre, tanto do ponto de vista quantitativo como do ponto de vista qualitativo. Essa maior capacidade de marcação permite que possam ser injetadas quantidades muito menores dos conjugados em relação ao HRP livre sem que isso diminua a capacidade de evidenciar somas e fibras marcadas. Esse fato é muito importante já que, injetando pequenas quantidades, a possibilidade de ocorrer contaminação em razão da difusão do neurotraçador sobre tecidos vizinhos à área injetada diminui drasticamente.

Nossos resultados confirmam observações anteriores que indicam uma melhor captação dos conjugados em relação ao HRP livre.<sup>3,14</sup> A superioridade do CTB-HRP sobre o HRP-WGA, descrita em outros trabalhos que utilizaram modelos experimentais semelhantes ao nosso, foi apenas verificada ao analisar a qualidade de marcação da árvore dendrítica. De fato, o CTB-HRP permitiu uma visualização mais detalhada dos dendritos dos motoneurônios, o que forneceu informações adicionais ao estudo anatômico. Em relação à quantidade de neurônios marcados, embora não tenhamos realizado um estudo pormenorizado, não apreciamos diferenças entre ambos os conjugados, ainda que tenhamos constatado um número muito menor de neurônios marcados ao utilizar o HRP livre, o que confirma observações anteriores.

A maior capacidade do CTB-HRP em marcar a árvore dendrítica dos motoneurônios (Figura 1-B), e a marcação transganglionar de fibras sensoriais (trigeminais nesse caso) observada apenas após injeções de HRP-WGA (Figura 2-A), nos permitem deduzir que, possivelmente, esses conjugados são captados por diferentes tipos de fibras. Isso parece confirmar observações anteriores que indicam que o HRP-WGA é melhor transportado através de fibras amielínicas e fibras mielinizadas de pequeno diâmetro, enquanto o conjugado CTB-HRP parece ser melhor captado por terminais ligados a fibras mielinizadas de grande diâmetro (como as fibras motoras).<sup>8</sup>

A vantagem de ambos os conjugados sobre o HRP para traçar vias nervosas e que pode ser constatada nesse experimento, se explica pelas diferenças que se observam na captação do neurotraçador pela membrana celular. Como já tem sido descrito, a possibilidade de demonstrar conexões neurais utilizando HRP ou outros neurotraçadores se fundamenta, em parte, nos processos de endocitose de moléculas extracelu-

lares que o neurônio desenvolve, e pelo fato das vesículas originadas dessa endocitose serem ativamente transportadas de forma retrógrada ou anterógrada no interior do neurônio. Essa endocitose ocorre através da membrana celular, fundamentalmente nos terminais axônicos, corpo celular e ramos dendríticos e está relacionada a processos de reciclagem de vesículas que constantemente coalescem na região sináptica.

No caso do HRP livre, esse tipo de endocitose se dá na base apenas de um gradiente de concentração (*fluid-phase endocytosis*). No caso dos conjugados, se observa uma união intensa desses a receptores específicos da membrana, o que inicia um processo de endocitose adsorptiva. Segundo Silverstein et al.,<sup>12</sup> a endocitose adsorptiva é um processo de incorporação intracelular muito mais eficiente que a incorporação que se realiza em razão dos diferentes gradientes de concentração. No caso do conjugado HRP-WGA, receptores de membrana denominados *n-acetyl-glucosamine* unem-se ativamente à aglutinina do germe de trigo e a outras lecitinas naturais, iniciando processos de endocitose adsorptiva, que se soma à endocitose decorrente de gradientes de concentração. No caso do CTB-HRP, gangliosídeos do tipo GM1,<sup>4,8</sup> outro tipo de receptor de membrana, apresentam uma afinidade muito grande com a subunidade B da toxina colérica, o que desencadeia também processos de endocitose adsorptiva. O fato destes gangliosídeos serem particularmente abundantes na membrana presináptica da junção neuromuscular, explicaria a superioridade do conjugado CTB-HRP em modelos experimentais em que o neurotraçador é injetado diretamente no músculo.

## Conclusão

Nossos resultados permitiram concluir que:

- os conjugados CTB-HRP e HRP-WGA são superiores ao HRP livre no que se refere à capacidade de traçar vias neurais retrógradas;
- o conjugado CTB-HRP é o indicado para traçar conexões neurais retrógradas, fundamentalmente motoras, em modelos experimentais em que o neurotraçador deve ser injetado diretamente no músculo, e seja importante estudar o padrão de arborização dendrítica;
- o conjugado HRP-WGA, além de ser eficiente para traçar vias retrógradas, tanto motoras como sensitivas, apresenta a capacidade de marcar terminações axônicas, o que o converte também num neurotraçador anterógrado.



CRUZ-RIZZOLO, R. J., DEROGIS, A., LORENZATO, F. Comparative study of free HRP and HRP conjugates in the examination of the connectivity between orofacial structures and the central nervous system. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.26, n.2, p.461-470, 1997.

- **ABSTRACT:** *The use of neurotracers has revolutionized in the last three decades the knowledge on the connectivity between the peripheral structures and the nervous system. Between these neurotracers, the horseradish peroxidase (HRP) has been the most used. Recently, combinations of this neurotracer with the wheat germ agglutinin (WGA) or with the sub-unit B of the cholera toxin (CTB) have demonstrated a substantial increase in the transport of the resulting conjugates (HRP-WGA, CTB-HRP), with a sensible improvement in their capacity to trace neuronal connections. In order to compare these different neurotracers, we injected in the posterior half of the tongue of rats 10 µl of free HRP (20%) or 10 µl of CTB-HRP (0.15% of cholera toxin + 12% HRP) or 10 µl of HRP-WGA (5% of WGA + 30% HRP). After a 48-hour survival period, the animals were perfused with an aldehyde mixture and, later on, the brains were cut in a freezing microtome. Brain stem slices were submitted at the histochemical reaction, using tetramethylbenzidine as cromogen, and the hypoglossal nucleus, responsible for the tongue motor innervation, was studied. Our results indicate that the conjugates HRP-WGA and CTB-HRP are more efficient than the free HRP. The conjugates have similar efficiency, although the CTB better marks the dendritic tree. This characteristic of the conjugated CTB-HRP could be associated with the abundance of GM1 ganglioside in the pre-synaptic membrane of the neuromuscular junction. These gangliosides form a group of specific receptors for components of the cholera toxin B sub-unit, that increase their reception for the axonic terminal.*
- **KEYWORDS:** *Neurotracers; horseradish peroxidase; wheat germ agglutinin; cholera toxin; hypoglossal nucleus.*

## Referências bibliográficas

- 1 BRUSHART, T. M., MESULAM, M. -M. Transganglionic demonstration of central sensory projections from skin and muscle with HRP-lectin conjugates. *Neurosci. Lett.*, v.17, p.1-6, 1980.
- 2 GONATAS, N. K. et al. Superior sensitivity of conjugates of horseradish peroxidase with wheat germ agglutinin for studies of retrograde axonal transport. *J. Histochem. Cytochem.*, v.27, p.728-34, 1979.
- 3 GROB, P. et al. Comparison of the retrograde tracer properties of (<sup>125</sup>I) wheat germ agglutinin (WGA) with HRP after injection into the corpus callosum. *Brain Res.*, v.236, p.193-8, 1982.

- 4 HIRAKAWA, M., McCABE, J. T., KAWATA, M. Time-related changes in the labeling pattern of motor and sensory neurons innervating the gastrocnemius muscle, as revealed by the retrograde transport of the cholera toxin B subunit. *Cell. Tissue Res.*, v.267, p.419-27, 1992.
- 5 KITAMURA, S. et al. An HRP study of the motoneurons supplying the rat hypobranchial muscles: central localization, peripheral axon course and soma size. *Anat. Rec.*, v.216, p.73-81, 1986.
- 6 KRISTENSSON, K., OLSSON, Y. Retrograde axonal transport of a protein. *Brain Res.*, v.29, p.363-5, 1971.
- 7 LaVAIL, J. H., LaVAIL, M. M. Retrograde axonal transport in the central nervous system. *Science*, v.176, p.1416-7, 1972.
- 8 MASLANY, S., CROCKETT, D. P., EGGER, M. D. Organization of cutaneous primary afferent fibers projecting to the dorsal horn in the rat: WGA-HRP versus B-HRP. *Brain Res.*, v.569, p.123-35, 1992.
- 9 MESULAM, M. -M. *Tracing neural connections with horseradish peroxidase*. Chichester: John Wiley and Sons, 1982. 251p.
- 10 MIZUNO, N. et al. Representation of the masticatory muscles in the motor trigeminal nucleus of the macaque monkey. *Neurosci. Lett.*, v.21, p.19-22, 1981.
- 11 MONG, F. S., CHEN, Y. C., LU, C. H. Dendritic ramifications of trigeminal motor neurons innervating jaw-closing muscles of rats. *J. Neurol. Sci.*, v.86, p.251-64, 1988.
- 12 SILVERSTEIN, S. C., STEINMAN, R. M., COHN, Z. A. Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.*, v.46, p.669-722, 1977.
- 13 TSAI, T. C. et al. Studies of the motoneurons following the injection of horseradish peroxidase into the peripheral branches of the facial nerve in rats. *Acta Anat. Basel.*, v.148, p.42-8, 1993.
- 14 WAN, X. T. et al. Cytoarchitecture of the extranuclear and commissural dendrites of hypoglossal nucleus neurons as revealed by conjugates of horseradish peroxidase with cholera toxin. *Exp. Neurol.*, v.78, p.167-75, 1982.